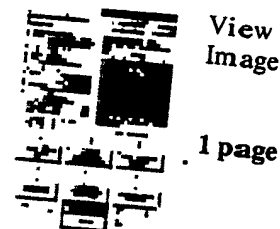


Title: **JP1193300A2: HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY AND PRODUCTION THEREOF**

Country: **JP Japan**  
Kind: **A**

Inventor(s): **OCHI HIROSHI  
OTSUKA HIROSHI  
HIGUCHI ATSUKO  
YOKOTA SHINICHI  
NOGUCHI HIROSHI  
KOZUKI TSUNEO  
KATO MASUHIRO  
OKUDA TAKAO**



Applicant/Assignee:  
 **Inquire Regarding Licensing**

**SUMITOMO CHEM CO LTD  
SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD**  
News, Profiles, Stocks and More about this company

Issued/Filed Dates: **Aug. 3, 1989 / Jan. 27, 1988**

Application Number: **JP1988000017958**

IPC Class: **C07K 15/04; A61K 39/395; C12N 5/00; C12N 15/00;  
C12P 21/00; G01N 33/569; G01N 33/577; C12P 21/00;**

Priority Number(s): **Jan. 27, 1988 JP1988000017958**

Abstract:



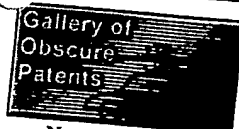
**NEW MATERIAL:** An antibody exhibiting a specific binding to *Pseudomonas aeruginosa*-common antigen OMP-19 having following properties. Properties of OMP-19; Constituent: proteinic substance which antigenicity disappears by treatment with proteinase K. Molecular weight; apparent molecular weight 19000 with 0.2% sodium dodecyl sulfate. 12.5% polyacrylamide-gel-electrophoresis under reduced condition, after heat-treatment at 73°C for 10min in the presence of 1% sodium dodecyl sulfate and 5% 2-mercaptoethanol. Characteristics; existing in an outer-membrane fraction of almost all *Pseudomonas aeruginosa* without depending on a serotype of *Pseudomonas aeruginosa*. USE: A preventive and remedial agent as well as diagnosticum of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis, which has high therapeutic effect and low side effect, and allows stable and large-scale production of a safe antibody with high titer. PREPARATION: A human lymphocyte B cell having a potency to produce the said antibody is fused with a mouse myeloma cell, and a hybridoma obtained is propagated to produce the aimed antibody.

**COPYRIGHT: (C)1989,JPO&Japio**

Family: **none**

Other Abstract Info: **DERABS C89-266867 DERC89-266867**

Foreign References: **No patents reference this one**



Nominate this

**BEST AVAILABLE COPY**

## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-193300

⑤ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)8月3日

C 07 K 15/04  
A 61 K 39/395  
C 12 N 5/00R-7252-4C  
B-8515-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全12頁)

⑭ 発明の名称 ヒトモノクローナル抗体およびその製法

⑮ 特 願 昭63-17958

⑯ 出 願 昭63(1988)1月27日

⑰ 発 明 者 越 智 宏 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
内⑱ 発 明 者 大 塚 浩 史 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
内⑲ 発 明 者 樋 口 敦 子 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
内

⑳ 出 願 人 住友化学工業株式会社 大阪府大阪市東区北浜5丁目15番地

㉑ 出 願 人 住友製薬株式会社 大阪府大阪市東区道修町2丁目40番地

㉒ 代 理 人 弁理士 諸石 光熙 外1名

最終頁に続く

## 1. 発明の名称

ヒトモノクローナル抗体およびその製法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 下記の理化学的性質を有する緑膿菌共通抗原OMP-19に対して特異的結合を示すヒトモノクローナル抗体。

OMP-19の理化学的性質:

構成成分

蛋白分解酵素プロテインナーゼK処理により、その抗原性を消失することを特徴とする蛋白性物質

分子量

1%ドデシル硫酸ナトリウムおよび5%2-メルカプトエタノールの存在下で73℃10分間加熱処理した場合、還元状態下での0.2%ドデシル硫酸ナトリウム・12.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動において見かけの分子量19,000を示し、かつ、上記条件にて100℃10分間加熱処理した場合、上記条件の電気泳動において見かけの分子量25,000を示す。

## 特性

緑膿菌の血清型に依らず、ほとんどすべての

緑膿菌の外膜画分に存在する共通抗原

(2) 緑膿菌臨床分離株の70%以上に血清型の種類を問わずに結合能を有する第1請求項記載のヒトモノクローナル抗体

(3) 緑膿菌の血清型Mに対して特に強い親和性を有することを特徴とする第1請求項記載のヒトモノクローナル抗体

(4) ヒトモノクローナル抗体がIgG又はIgMである第1, 2あるいは3請求項記載のヒトモノクローナル抗体

(5) 第1, 2又は3請求項記載のヒトモノクローナル抗体を少なくとも一種類含有するヒト免疫グロブリン製剤

(6) 第1, 2又は3請求項記載のヒトモノクローナル抗体を少なくとも一種類含有する細菌感染症予防治療剤

(7) 第1, 2又は3請求項記載のヒトモノクローナル抗体を少なくとも一種類含有する緑膿

## 菌感染症診断薬

(8) 第1, 2又は3請求項記載のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマおよびその子孫細胞系

(9) ハイブリドーマYK-1H5(微工研菌寄第9782号)

(10) 第1請求項記載のOMP-19に対する抗体を産生する能力をもつヒトリンバ球B細胞と、マウス由来ミエローマ細胞又はヒト・マウス由来のヘテロ・ミエローマ細胞とを細胞融合させることにより、両細胞間のハイブリドーマを形成させ、このハイブリドーマを増殖させることによって抗体を生産しこれを取得することを特徴とする、第1請求項記載のOMP-19に対するヒトモノクローナル抗体を製造する方法

## 3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、緑膿菌に対するヒトモノクローナル抗体、その製造法およびその用途に関する。

場合が多い細菌感染として知られている。

細菌感染を予防・治療する方法として、まず第一にあげられるのが、抗生物質および合成抗菌剤を用いた化学療法である。ストレプトマイシン、カナマイシン、ペニシリンやセファロスポリンなど幾多の抗生物質が開発され、その多くはぶどう球菌を代表とするほとんどのグラム陽性球菌や、大腸菌などのグラム陰性菌に感受性を示し、著効な臨床効果を示してきた。しかしながら、今日までの多くの研究開発にもかかわらず、緑膿菌に感受性を示す薬剤は依然少ないのが現状であり、しかも、今日、感受性を示すとされる薬剤でも、そのほとんどが、緑膿菌に対してその増殖を単に阻害するいわゆる静菌的に作用するのみで、殺菌力に欠けており、臨床の場において著効な治療効果を示すに至っていない。ところで、細菌感染症を予防および治療することができる療法として、免疫グロブリン製剤の投与、いわゆる抗体療法があり、抗生物質療法と併用される、又は、それに代わるものとして注目されている。ウマや

更に具体的には、共通抗原としての緑膿菌外膜蛋白に対するヒトモノクローナル抗体で、緑膿菌の血清型の種類を問わず幅広く結合し、更に緑膿菌血清型Mに特に親和性が強いことを特徴とする。本発明の抗体は、緑膿菌を含む感染症の予防治療剤および緑膿菌感染症の診断用試薬として有用である。

従来の技術および解決すべき課題

細菌感染症の治療において問題となる病原菌は、抗生物質の開発とともに変化している。すなわち、臨床上用いられる抗生物質の種類の変遷に伴ない細菌感染症を引き起こす細菌、いわゆる起炎菌が交代してきた。従来、低病原性または弱毒性といわれた細菌、なかでも、特に緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)による感染例が増加し、緑膿菌は近年、主要な病原菌の一つとなっている。緑膿菌感染は、免疫抑制剤の投与を受け免疫能の低下している患者、又は癌患者や熱傷患者および新生児などの免疫不全・低下症の患者において重篤な症状を引き起こし死に至らしめる

ウサギ等の動物を能動的に免疫することによって抗体価の高い血清を得ることができ、その血清を投与する抗体療法は、各種の動物を用いた実験的感染症において著効な治療効果を示すことが多くの実験にて実証されている。ヒト以外の動物由来の血清を用いた抗体療法がヒトにおいても有効性を示すことは、ジフテリア毒素や蛇毒の例で周知のことである。しかしながら、ヒト以外の動物から得られた異種蛋白をヒト体内へ移入する方法は、アナフィラキシーやその他のアレルギー反応などの重篤な副作用を引き起こし一般細菌感染症の治療法として採用されるに至っていない。かくして、細菌に対して高い抗体力価を有し、細菌感染症の治療効果の大きいヒト免疫グロブリンの開発が望まれている。

従来のヒト免疫グロブリン製剤は、健康人又は細菌感染既応患者から血液を採取し、既知の方法にて免疫グロブリン画分を分取・精製した後に、ポリエチレングリコール添加、蛋白分解酵素処理、スルホン化、DEAE-カラムクロマトグラフィー等

の、凝集物を除去する方法により筋肉注射用のみならず、静脈注射用に製剤化されたものである。これらヒト免疫グロブリン製剤には、ヒト以外の異種動物由来の免疫グロブリンを投与した時にみられるアナフィラキシー等の副作用は無い等の利点をもつが、幾つかの欠点をもつ。第一に、細菌に対する抗体価が低く、必ずしも充分な治療効果を期待しえない。第二に、高力価の免疫グロブリンを大量に安定して供給することが難しい。

健康人ボランティアや患者より採取された血液を材料に製造されており、高い力価の血清を一定して入手することは極めて難しく、製造ロット毎に、抗体価が変動することがある。第三に、任意のヒトの血液を材料に製造されることにより、免疫グロブリン製剤に HB ウイルスなどの肝炎ウイルスや Adult T cell leukaemia virus (ATLV, HTLV) などが混入することがあり得る。これらの問題を解決すべく、本発明者らは、従来のヒト免疫グロブリン製剤やマウスモノクローナル抗体に代わるものとして、細菌感染症の予防および治療に

有効かつ有用なヒトモノクローナル抗体の作製およびその応用を検討した。

緑膿菌の菌体表層で最も外側に存在する、O-抗原 (O-多糖体) と呼ばれる多糖体の構造は多種多様である。現在までに後述するいくつかの血清型標準株に対して、そのO-抗原の構造が解析され報告されている (Eur. J. Biochem., 155, 659-669, 1986; Eur. J. Biochem., 134, 289-297, 1983; Eur. J. Biochem., 106, 643-651, 1980; Eur. J. Biochem., 150, 541-550, 1985; Eur. J. Biochem., 125, 229-237, 1982; Eur. J. Biochem., 167, 549-561, 1987)。

しかしながら、O-抗原の構造決定には、多大の労力を必要とする為に、現在、緑膿菌の分類には、標準株のO-抗原に対して調製された抗血清又はマウスモノクローナル抗体が利用されている。すなわち、それらの抗体 (抗血清) との免疫学的反応性の差異によって分類される。血清型による分類と呼ばれる。

本間による血清型 1~17 (17種類) の分類

(Japan, J. Exp. Med. 44, 1, 1974)、Fisherによる血清型 1~7 (7種類) の分類 (J. Bacteriol., 98, 835, 1969)、日本緑膿菌研究会血清型別検討委員会による血清型 A~M (13種類) の分類 (Japan, J. Exp. Med. 46, 329, 1976)、International Antigenic Typing System (IATS) による血清型 1~17 (17種類) の分類 (Int. J. Syst. Bacteriol., 33, 256, 1983)、等が知られている。各々の分類およびその相互関係を表 1 に示す (Japan, J. Exp. Med. 46, 329, 1976)。

表 1 緑膿菌血清型別分類

Japanese Committee * 1976	Homma 1974	IATS** 1983	Fisher 1969
A	1	3	-
B	2, 7, 13, 16	2, 5, 16	3, 7
C	3	8	6
D	4	9	-
E	5	11	2
F	6	4	-
G	8	6	1
H	9	10	5
I	10	1	4
J	11	15	-
K	12	13	-
L	14	-	-
M	15, 17	-	-
-	-	7, 12, 14, 17	-

\* 緑膿菌研究会血清型別検討委員会

\*\* 国際抗原タイピングシステム

(International Antigenic Typing System)

血清型特異抗原であるO-抗原に対する抗体は、対応する血清型の緑膿菌による感染症に対しては、優れた予防・治療効果を示すこと、しかしながら、その他の対応しない血清型緑膿菌に対しては効果の無いことが知られている。13~17種類の血清型緑膿菌のすべてに効力を発揮する為には、各々の13~17種類のモノクローナル抗体を混合して用いることが考えられるが、極めて煩雑であり実用化は困難である。

本課題を解決する一つの方策は、緑膿菌共通抗原の解明と、その共通抗原を認識し、すべての血清型緑膿菌に対して反応する抗体を作製することである。緑膿菌共通抗原の一つとしては、外膜蛋白質が考えられる。例えば、Hancockらは、外膜蛋白質として、8種類 (D1, D2, E, F, G, H1, H2 および I) を確認しその性状の一部を明らかにして

いる。(J. Bacteriology, 140, 902, 1979)。  
D1, D2, F, G, H1は加熱処理の程度によりドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE と略す)における泳動度(見かけの分子量)の変化する熱可変性蛋白(heat-modifiable protein)であると報告されている。その熱変性の前後の分子量、及び遷移温度(transition temperature)を表2に示す。

表2 緑膿菌由来の熱可変性外膜蛋白

外膜蛋白	見かけの分子量( $10^3$ ) <sup>*</sup>		遷移温度
	低温	高温	
D1	35.5	46	50-56
D2	35.5	45.5	50-56
F	39	41	100(50min)
G	19	25	75-82
H1	18.2	21	65-73
H2	20.5	20.5	—
I	9.0-14	9.0-12	—

\* 2% SDS-5% 2-メルカプトエタノール存在下にて、各温度で可溶化後、14% SDS-PAGEにて分析した分子量(文献: J. Bacteriol., 140, 902-910, 1979)

また、それら外膜蛋白質に対する抗血清を用いた

したF, H<sub>2</sub>, I及びFBP以外の外膜蛋白質に対するモノクローナル抗体(マウス、ヒトを問わず)の報告はない。

さらに、いずれの外膜蛋白質に対してもヒトモノクローナル抗体の作製例およびそれを用いた治療効果の検討はその例が無い。臨床場において、緑膿菌感染症の予防・治療に用いる場合、異種蛋白からのアレルギー等の副作用を軽減する為には、ヒトモノクローナル抗体の投与が望ましいと考えられ、もし、予防・治療効果をもつヒトモノクローナル抗体が作製されれば産業上価値が大きいことは論を持たない。

以上、外膜蛋白D1, D2, E, F, G, H1, H2, IおよびFBPが共通抗原であること、それらの分子量およびそれらのうち、D1, D2, F, G, H1は熱可変性蛋白であることが明らかになっている。又、F, H<sub>2</sub>, I及びFBPに対しては、マウスモノクローナル抗体が作製され研究に用いられている。しかしながら、未知の外膜蛋白又はそれに対応した抗体が感染症の予防・治療に関与している可能性がある上に、既

検討等により、F, H<sub>2</sub>, Iがワクチン等の候補として、重要であることを示し(J. Infect. Disease, 146, 770, 1982)、さらに、H<sub>2</sub>, Iに対するマウスモノクローナル抗体(Infect. Immun., 37, 166, 1982)、及びFに対するマウス・モノクローナル抗体を取得し、(Infect. Immun., 42, 1027, 1983)、Fに対するマウス・モノクローナル抗体が、マウス・実験緑膿菌感染症モデルを用いたin vivo感染治療実験において、有効であることを確認している(Eur. J. Clin. Microbiol., 4, 224, 1985)。

また Sokolらは、ferripyochelin-binding protein(FBP)が緑膿菌共通抗原であり、かつ、FBPに対するマウス・モノクローナル抗体がマウス実験緑膿菌感染症モデルにおいて有効であることを示している(Infect. Immun., 51, 896, 1986)。

しかし、現状では個々の緑膿菌外膜蛋白質の性状、機能等が十分に解明されているとは言えず、特に、緑膿菌の病原性との関係の解明が重要な課題である。また、Hancock 及び Sokolらの検討

知外膜蛋白のD1, D2, G 及びH1に対するマウスモノクローナル抗体に関してさえも現在のところ、その報告が見られず、今後の研究課題として残る。又、緑膿菌感染症の予防・治療に役立つヒト抗緑膿菌外膜蛋白モノクローナル抗体の報告もないのが現状である。更には、いかなる共通蛋白抗原およびそれらに対する抗体が、緑膿菌感染症の予防・治療において実用的に有効であるのかが、わかっていないのが現状であり、現在までに得られた知見から、有効かつ有用な共通抗原および抗体を演繹的に(a priori)に予測することも不可能である。

一方、緑膿菌感染症による死亡率が高いのう胞性線維症(Cystic fibrosis)において、緑膿菌血清型Mが起炎菌として特徴的に高い頻度で分離されている(Infect. Immun., 42, 170-177, 1983)。Cystic fibrosis 以外の通常の緑膿菌感染症においても数%の頻度で起炎菌として分離されていることも考慮すれば、血清型Mに対して予防・治療効果をもつヒトモノクローナル抗体の実用化が望

まれる。しかるに、血清型Mはその菌体表層にO-抗原を持たないことが明らかになっている(Japan J. Exp. Med., 52, 317-320, 1982)。

こうした状況に鑑み、本発明者らは前述の問題点を改善すべく、鋭意改良を加え、緑膿菌のO抗原以外の共通抗原に着目し、ほとんどの血清型菌に共通に結合し、緑膿菌感染症に有効なヒトモノクローナル抗体、およびそれを含む高力価ヒト免疫グロブリン、およびそれを生体外にて安定的かつ大量に製造する方法を確立し、かつ、その過程のなかで、該ヒトモノクローナル抗体が緑膿菌血清型Mに対して特に高い結合の親和性を有すること、および血清型Mによる緑膿菌感染症に有効であることをみだして、本発明を完成するに至った。

#### 発明の概要

本発明は、緑膿菌の共通抗原OMP-19を認識し、緑膿菌の臨床分離株の70%以上の細菌に、血清型の種類によらず結合し、かつ、なかでも血清型Mに特に強い結合の親和性を有するヒトの抗体、特

これらの樹立株を試験管内培養し、培地中に分泌される抗体を精製することにより抗体を大量に製造する。

該ヒトモノクローナル抗体は、OMP-19と呼ばれる共通抗原へ結合することによって、血清型の種類を問わずに、ほとんどすべての緑膿菌の菌体表層に結合し、補体や貪食細胞の関与を経て緑膿菌感染症を予防・治療することが出来る。また、血清型Mの緑膿菌に対して、該ヒトモノクローナル抗体は特に強い結合活性を有し、強い治療効果を示す。

更には、該ヒトモノクローナル抗体は、血清型に依らずに緑膿菌共通抗原OMP-19を認識する為に、緑膿菌の分離・鑑別に用いることができる。

本発明によって得られる緑膿菌共通抗原OMP-19に対するヒトモノクローナル抗体は、OMP-19と新しく命名された蛋白性構成成分を抗原決定基として特異的に認識する1つの抗体産生細胞クローンに由来する単一な(homogenous)ヒト型の抗体を指す。また、本抗体は、血清型Mに強い結合親和

に単一な抗原特異性をもつモノクローナル抗体(単一性抗体)の生産方法に係わり、更に特定するに特異抗体を連続的に産生し得るヒト細胞株の取得方法およびその細胞をin vitro培養することを含む特異抗体の製造方法およびそれによって得られた該特異モノクローナル抗体を少なくとも一種類含む、感染予防・治療用のヒト免疫グロブリン製剤、又は診断用試薬としてのヒトモノクローナル抗体に関するものである。

緑膿菌共通抗原OMP-19と特異的に反応し、血清型Mに特に強い結合親和性を有しながら、他の血清型菌にも幅広く結合しうるヒトモノクローナル抗体を連続的に産生するヒト細胞株が本発明によって取得される。生体内又は生体外にて緑膿菌、好ましくは緑膿菌共通抗原OMP-19により感作されたヒトリンパ球B細胞を骨髓腫細胞(ミエローマ: myeloma)又はBリンパ芽球様細胞(B lymphoblastoid cell)と細胞融合することにより、試験管内にて連続的に細胞増殖し、かつ所望の特異抗体を連続的に産生する細胞株を樹立する。

性を有し、かつ、他の血清型菌のほとんどと幅広く結合しうることを特徴とする。

OMP-19とは、緑膿菌の外膜に由来する蛋白性物質で、蛋白分解酵素プロテインナーゼK処理によりその抗原性を消失し、更には、1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)および5%2-メルカプトエタノール(2-ME)の存在下で、73℃10分間加熱処理した場合、還元状態下での、0.2%SDS-12.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、見かけの分子量19,000を示し、かつ、上記条件にて100℃10分間加熱処理した後、上記条件の電気泳動において、見かけの分子量25,000を示す。この蛋白性物質OMP-19は、緑膿菌の血清型に依らず、ほとんどすべての緑膿菌に存在する共通抗原である。OMP-19は、通常の生化学的手法、好ましくは菌体外膜蛋白の精製法を用い、上記の理化学的性質を指標として、緑膿菌菌体より分離精製される。また、該ヒトモノクローナル抗体を用いたアフニティー・カラムクロマトグラフィーを用いて、容易に精製される。

Hancock らの報告(J. Bacteriol. 140, 902, 1979)している8種類の外膜蛋白(D1, D2, E, F, G, H1, H2およびI)の理化学的性質を比較すると、蛋白Gもしくは、H1の性状が、OMP-19の性状と比較的類似しているが、現状では、その異同は明らかでない。但し Hancockらが、マウスモノクローナル抗体を取得した蛋白F, H2 及びIとは明らかに性状が異なり、異なった蛋白質である。緑膿菌の血清型とは、Fisherら(J. Bacteriol. 98, 835, 1969)や本間ら(Japan. J. Exp. Med., 44, 1, 1974)の抗血清を代表とする緑膿菌標準株に対する特異的な抗血清(抗体)との反応性を用いた緑膿菌の分類を指す。現在、13~17種類の血清型に分類される(Japan. J. Exp. Med., 46, 329, 1976)。主として、外膜中に存在するリボポリサッカライドLPS中のO-多糖体部分の繰返し単位の構造(組成、配列、配位)の差に対応している。

緑膿菌共通抗原とは、上記の血清型に依らず、すべての緑膿菌に存在し、かつ抗原性を有する分子を指す。1例として外膜蛋白ヤリビドAがあ

る。

緑膿菌外膜蛋白とは、細菌表層の三層構造のうち、外側に位置する外膜に存在する蛋白を指す。蛋白D1, D2, F, G, H1, H2, Iやferripyochelin-binding protein(FBP)などが知られるが、その他の未同定物質も含まれる。

モノクローナル抗体とは、細胞融合法(Nature, 256, 495, 1975)あるいは、EBウィルス・トランスフォーメーション法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 70, 190, 1973)などにより得られる、単一の抗体産生細胞クローンにより産生される、均一な分子構造を有する抗体を指す。

抗体は、抗原と特異的に結合する糖蛋白で、リンパ球B細胞によって産生される。IgG, IgM, IgD, IgA およびIgEのクラスに分類されている。例えばIgGは、分子量約50,000の重鎖(H鎖)2本および分子量約25,000の軽鎖(L鎖)2本から成る約150,000の分子量を有する。各々の重・軽鎖は、ジスルフィド残基によって共有結合されている。IgGの1分子は、Fab部分を介して、2分子の抗

原を特異的に結合する。

本発明を以下、更に詳細に説明する。

本発明に含まれるヒトモノクローナル抗体の製造方法は、基本的に、以下の諸過程にわけることができる。

- ①抗原感作されたヒトリンパ球B細胞の調製、
- ②無制限増殖能力の賦与によるモノクローナルな特異抗体産生細胞株の樹立、③モノクローナルな特異抗体産生細胞株の培養、④培養液からのモノクローナルな特異抗体の精製、⑤モノクローナルな特異抗体を含む高力価免疫グロブリン製剤の調製。順次、以下に説明する。

ヒトのリンパ球B細胞とは、OMP-19に対する抗体を産生するヒトリンパ系細胞で、主として末梢血液よりリンフォブレイプ、モノポリ分離液などのリンパ球分離液を用いた遠心分離法によって分離されるが、各種疾患の診断および治療の目的で摘出されたリンパ節、脾臓などの臓器や臍帯血由来のリンパ球B細胞を材料に用いることもできる。緑膿菌による感染症を患ったことがあり、生体

内で感作された既応症のヒト由来のリンパ球B細胞を用いることが望ましい。あらかじめ、血清中の緑膿菌ホルマリン死菌あるいはOMP-19に対する抗体価を測定することにより適切なリンパ球提供者を選別することができる。また、別の方法として、緑膿菌症の有無を問わず、ヒトリンパ球B細胞を採取し、試験管内にて緑膿菌ホルマリン死菌、好ましくはOMP-19を混合することによって感作せしめることができる。すなわち、抗原としての緑膿菌ホルマリン死菌、好ましくはOMP-19をリンパ球B細胞に添加する。更にアメリカヤマゴボウレクチン(PWM)などの植物性レクチン、Con Aなどの菌体成分、又はヒトリンパ球の混合培養液や脾臓、胸腺細胞や臍帯血細胞培養液など、B細胞増殖因子およびB細胞分化因子等のリンフォカイン類を含む溶液を同時に、又はそれぞれの組み合わせで添加することによって試験管内にて抗原感作し、引き続き抗体産生細胞へと増殖・分化させたヒトリンパ球B細胞を用いることができる。これらのヒトリンパ球B細胞は、その細

胞表面に抗体分子を有し、ある限られた期間少量の抗体を分泌することが可能であるが、無制限に増殖することはできないことを特徴とする。抗原感作されたヒトリンパ球B細胞を無限に連続して増殖可能な細胞株とする方法としては、抗原感作されたヒトリンパ球細胞と骨髓腫細胞とをポリエチレングリコール(PEG)の存在下に細胞融合する方法を用いる。用いられる骨髓腫細胞はP3×63-Ag 8(P3)、P3×63-Ag 8、653などの、マウス骨髓腫細胞由来のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTと略)欠如変異株、ヒト骨髓腫細胞U-266由来のHGPRT欠如変異株又は、マウス骨髓腫細胞とヒト骨髓腫細胞、もしくは、マウス骨髓腫細胞とヒトリンパ球B細胞との細胞融合により得られるマウス・ヒトヘテロ骨髓腫細胞由来のHGPRT欠如変異株などを指す。骨髓腫細胞の代わりに、ヒトBリンパ芽球細胞由来のHGPRT欠如変異株を用いることもできる。PEGとしては、PEG1,000~6,000を30~50%(W/V)の濃度で用いる。レクチン、ポリーレー

リジンやDMSOなどを添加することにより融合効率を高めることもできる。融合方法は、マウス細胞同志を融合し、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得したKohler and Milsteinらの方法(Nature 256, 495, 1975)に準ずる。簡単に記述すれば、抗原感作されたヒトリンパ球細胞とHGPRTの欠如した骨髓腫細胞とを3~1:1の割合にて混合し、45%(W/V)PEG 1500~6000を0.5~1分間に少量ずつ加え、30秒~3分間静置する。その後、5~10分間に10~50mlの血清不含培地を加え、2mlのFCSを加え、37℃にて10~60分間インキュベートする。遠心後、培地を加え $10^5 \sim 10^6$ 個細胞/mlの濃度に調製し、96穴マイクロプレートに1ウエルあたり $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ 個の細胞を播種する。翌日、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン含有培地(HAT培地と略)又は、ヒポキサンチン・アザセリン含有培地(HAZ培地と略)に半量交換し、5%CO<sub>2</sub>、32~37℃にて培養する。約10~20日間新しいHAT培地又はHAZ培地に、続いて約3~5日間ヒポキサ

ンチン・チミジン含有培地(HTと略)又は、ヒポキサンチン含有培地(H培地と略)に、3日毎に半量ずつ交換を続け約2~3週間培養して、増殖してくるコロニー、いわゆるハイブリドーマを得る。HGPRT欠如変異株を用いることなく、代謝阻害剤を組み合わせることによってハイブリドーマを選択することも可能である。ハイブリドーマの培養液の17種類の血清型別パネルから成る17種類の緑膿菌ホルマリン死菌あるいはOMP-19に対する抗体価をELISA法又はラジオイムノアッセイ(RIAと略)によって測定し、更には、ウエスタン・ブロッティングの手法を併用することにより、OMP-19に対する特異抗体産生株を選別する。限界希釈法又は軟寒天法によって、2~3回クローニングを繰り返し、増殖の速い、特異抗体産生量の多い、安定した細胞株を得る。

以上、細胞融合法(cell fusion method; hybridoma method)を用いて、抗原感作ヒトリンパ球B細胞より樹立された細胞株は、連続的に増殖することができること、しかも、特異抗体を安定的に、

かつ大量に産生し得ることを特徴とする。

これら樹立されたハイブリドーマ( $0.5 \sim 5 \times 10^5$ 個細胞/ml)を通常の動物細胞培養培地にてCO<sub>2</sub>インキュベーターを使用して2~10%CO<sub>2</sub>、32~37℃の条件のもとで培養フラスコやプレート等の容器内で静置培養又は回転培養する。特に大量に培養する時は、動物細胞用に設計されたジャーファーメンターやホロファイバーシステム等を用いることもできる。通常の動物細胞培養用培地とは、ウシ胎児、仔ウシ、ウシ、ウマおよびヒトなどの血清を2~20%含有するRPMI 1640、Eagle's MEMに代表される培地、又は、インシュリン、トランスフェリン、エタノールアミン、セレンナイト、ウシアルブミン、リビドなど細胞の増殖に必要な微量成分を含む無血清培地を指す。上記の試験管内細胞培養以外に、ハイブリドーマをヌードマウスなどの動物体内へ接種することによって細胞を腹腔などの体内にて培養することも可能である。マウスやヌードマウスの場合、1匹あたり $0.5 \sim 2.5 \times 10^7$ 個の細胞を腹腔内投与す



る。この場合、細胞接種前に、プリスタンや抗アシアロGM<sub>1</sub>抗体を投与することが望ましい。

X線照射や摘脾手術も有効の場合がある。

抗体の精製は通常の生化学的手法を組み合わせることによってなされる。すなわち、硫酸沈澱分画法、エタノール沈澱分画法、PEG分画法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、電気泳動法等である。精製過程において、凝集物の形成や抗体活性の低下を防ぐ工夫が必要である。例えば、ヒト血清アルブミン(HSAと略)を0.05~2%の濃度で添加する。その他グリシンや $\alpha$ -アラニンなどのアミノ酸類、特にリジン、アルギニンやヒスチジンの塩基性アミノ酸、グルコースやマンニトールなどの糖類、塩化ナトリウムなどの塩類を添加することが好ましい場合がある。IgM抗体の場合、特に凝集しやすいことが知られている。 $\beta$ -プロピオニラクトンや無水酢酸などで処理することは、凝集を阻止することができ静脈内投与も可能とする。

して使用することもできる。従来のヒト免疫グロブリン製剤に、本発明により得られるヒトモノクローナル抗体を添加して、緑膿菌に対する高力価免疫グロブリン製剤とされる。

本発明によって得られるヒトモノクローナル抗体は、主としてクラスIgGおよびIgMに属するがこれに限定されるものではない。該ヒトモノクローナル抗体は、共通抗原OMP-19分子への結合を介して緑膿菌表層へ結合して、菌体をオプソニン化することにより貪食細胞による貪食・殺菌作用の増強、又は補体を活性化することによる溶菌作用等により緑膿菌による実験的マウス感染症を治療することができる。

緑膿菌による感染症および、その細菌を含む混合細菌感染症の治療・予防に用いられる時、該ヒトモノクローナル抗体は、通常、成人に対し約0.5~500mg、好ましくは5~50mgが投与される。

以上、詳しく述べたように、本発明によって得られるOMP-19に対するヒトモノクローナル抗体は

精製されたヒトモノクローナル抗体は、生物学的製剤の製剤化に通常用いられる方法によって製剤化される。基本的には、メンブレンフィルター等による濾過除菌操作の後に、安定化剤とともに滅菌バイアルに凍結乾燥される。

該ヒトモノクローナル抗体製剤は、緑膿菌感染予防・治療剤として、OMP-19に対する1種類のヒトモノクローナル抗体より成ることも可能であるが、更に好ましくは、OMP-19分子の異なる抗原決定部位を認識しうる、2種類以上のヒトモノクローナル抗体と混合して用いられる。又、OMP-19以外の緑膿菌表層抗原、例えば、他の外膜蛋白質、あるいは、リボ多糖構成成分中のO-抗原など、さらには、緑膿菌由来の病原因子である外毒素、エラスターゼ、プロテアーゼなどの外酵素などを認識するヒトモノクローナル抗体あるいは従来型のヒト免疫グロブリン製剤と混合して使用される。更には、緑膿菌以外の細菌、ウィルス、真菌、原虫、癌細胞に対するヒトモノクローナル抗体、あるいは、従来型のヒト免疫グロブリン製剤と混合

、緑膿菌血清型別の種類を問わずに、70%以上の臨床分離株に結合すること、なかでも、難病と言われる、のう胞性肺気腫cystic fibrosisにおいて高頻度に分離される血清型Mに特に強い結合親和性を持ち、マウス実験的感染症の系で優れた治療効果を示すことが、第一の特徴である。その他、ヒト由来の蛋白であることより、異種蛋白の投与時にみられるアナフィラキシー等の副作用の少ないことが期待されるし、特定の細胞より生産・精製される抗体であることより、不特定多数のヒト血液より製造された従来の免疫グロブリン製剤にくらべ、未知のバイオハザードが混入してくる可能性の低いことが特徴である。又、本モノクローナル抗体の製造方法としては、生体外で、大量に、高力価の抗体を安定して製造することが特徴であり、従来のヒト血液より製造する方法にくらべ高力価など生物活性の点で、安定的供給ができるなど品質管理の点で優れる。

以上、本発明の基本となるものである。

次に実施例をあげて本発明をさらに具体的に説

明するが、本発明はこれのみに限定されないことは言うまでもない。

#### 実施例 1

ヒト・マウス細胞融合によるヒト抗OMP-19モノクローナル抗体産生株の樹立

##### 1) ヒト末梢血からのリンパ球の調製、及び培養

血清中の緑膿菌表層に対する抗体価が高いドナーより末梢血 100ml を採取した。遠心管（住友ベークライト、50ml 容積）に 15ml のモノポリ分離液（Flow. Lab.）を入れ、その上に更に末梢血 20ml を静かに重層した。低速遠心機（トミー精工、RS-20BH）を用い、2,500rpm（ローターTS-7）で、室温 15 分間遠心分離し、赤血球とリンパ球を分離した。リンパ球を含む部分を回収し、Dulbecco 改良 Eagle's MEM（以下 D-MEM と略す）で、3 回洗浄した後、細胞数を計算した。その結果、 $2.6 \times 10^6$  個のリンパ球を得た。

得られた末梢血リンパ球  $6 \times 10^7$  細胞を、抗原としてホルマリン処理緑膿菌死菌を含む 66ml のリンパ球培養用培地（後述）に懸濁し、1 ウエルあ

たり  $1.5 \times 10^6$  個のリンパ球細胞となるように、24 ウエルマイクロプレート（Costar, #3424）に分注し、5%  $\text{CO}_2$ , 37℃ にて、6 日間培養した。

上記のリンパ球培養用培地とは、非動化したウシ胎児血清（以下 FCS と略す）を 20% (v/v)、ビルビン酸ナトリウム (0.05mg/ml), 2-メルカプトエタノール ( $5 \times 10^{-3}\text{M}$ ), 20mM N-(2-ヒドロキシエチル) ピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸（以下 HEPES と略す）、アメリカヤマゴボウ由来植物レクチン（以下 PWM と略す）（Gibco Lab.）0.01% (v/v) を含有する RPMI-1640 培地を指す。

##### 2) 細胞融合

マウス・ミエローマ細胞 P3 $\times$ 63-Ag8.653 (ATCC #CRL1580, J. Immunol., 123, 1548, 1979) を D-MEM (10% FCS を含む) で継代しておき、そのうち、 $2.5 \times 10^7$  個の細胞を D-MEM にて 2 回洗浄した。

一方、実施例 1-1) の記載通り、末梢血リンパ球を 6 日間培養後、24 ウエルマイクロプレートより回収し、細胞数を計算したところ、 $5 \times 10^7$  個

のリンパ球が回収された。このリンパ球を D-MEM にて 3 回洗浄し、上記のマウス・ミエローマ細胞と混合し、遠心により細胞を沈査とした。

この沈査に、1ml のポリエチレングリコール (PEG) 溶液 (0.45g PEG4000 Merck, 0.45ml PBS(-), 0.1ml ジメチルスルフォキシド) を約 1 分かけて、遠心管を回転しつつ添加し、室温にて 1 分間静置した。

次に、D-MEM を 1 分間 2ml の割合で遠心管を回転しつつ添加し、これを 7 回繰り返した。最後に 2ml FCS を加えた後、37℃ にて 20 分間静置した。静置後、遠心により細胞を沈査として集め、15% FCS, 0.05 mg/ml ビルビン酸ナトリウム、0.2u/ml インスリン、0.15mg/ml オキザロ酢酸、100  $\mu$ M アザセリン、100  $\mu$ M ヒポキサンチンを含む 60ml の D-MEM 培地（以下 HAZ 選択培地と略す）に懸濁して、1 ウエルあたり  $8.7 \times 10^4$  個のミエローマ細胞となるように、96 ウエルマイクロプレート（Corning glass works, #25860 MP）に分注した。同時に、フィーダー層として、マウス BALB/C 脾臓

細胞  $1 \times 10^5$  個、及び、マウス BALB/C 腹腔浸出細胞  $1 \times 10^6$  個を各ウエルに添加した。このマイクロプレートを、5%  $\text{CO}_2$ , 37℃ にて培養し、2～3 日ごとに HAZ 選択培地にて半量を培地交換した。1 週間後に、HAZ 選択培地に替えて、HAZ 選択培地よりアザセリンを除いた H-培地にて、半量を培地交換した。その後は、アザセリン・ヒポキサンチンを含まないハイブリドーマ培養用 D-MEM 培地（15% FCS, 0.05mg/ml ビルビン酸ナトリウム、0.2u/ml インスリン、0.15mg/ml オキザロ酢酸を含む D-MEM 培地）にて、2～3 日ごとに半量を培地交換した。融合後約 3 週間の時点に増殖のみられたウエルの培養上清について、緑膿菌をグルタルアルデヒドにより固定した 96 ウエルマイクロプレート（Becton Dickinson Lab. #3912）を用いて酵素免疫測定法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA）により、緑膿菌表層抗原に対する抗体産生の有無を調べた。緑膿菌は本間の分類による 17 種類の血清型の標準株（ATCC および東大医科学研究所微生物株保存施設から入手可）を

用いた。1 ウエルで緑膿菌 IID5018 (本間血清型 15 型標準株) に対して強く反応する、また、他の血清型標準株に対しても有意に強く反応する IgG 抗体を産生していることが確認できた。このウエル中のヘテロ・ハイブリドーマを、拡大培養及び、限界希釈法 (limiting dilution) によりクローニングを行い、安定にヒト IgG 抗体を産生する細胞株 YK-1H5 が得られた。以下、細胞株 YK-1H5 の産生するヒトモノクローナル抗体に対しても、YK-1H5 の名称を用いる。

ハイブリドーマ YK-1H5 は、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第 9782 号として寄託されている。

#### 実施例 2

YK-1H5 の産生する IgG 抗体の本間血清型別標準株に対する反応性の検討

ELISA により、YK-1H5 の産生する IgG 抗体の本間の血清型標準株に対する反応性を検討した。その結果を表 3 に示した。

表 3 から、YK-1H5 の産生する IgG 抗体は、血清型

によらず、いろいろな血清型に対して、広く結合した。また、血清型 15 および 17 に対しては、特に強い結合を示した。

表 3 YK-1H5 (IgG) の血清型別標準株への結合性

菌 株	本 間 血 清 型	Japanese committee	ELISA 値 (OD <sub>495</sub> )
IID 1001	1	A	0.28
IID 1002	2	B	0.41
IID 1021	3	C	0.23
IID 1004	4	D	0.47
IID 1130	5	E	0.66
IID 1006	6	F	0.58
IID 1007	7	B	0.41
IID 1020	8	G	0.25
IID 1009	9	H	0.91
IID 1010	10	I	1.39
IID 1011	11	J	0.92
IID 1012	12	K	0.26
IID 1013	13	B	0.19
IID 5141	14	L	1.02
IID 5018	15	M	2.42
IID 5004	16	B	0.35
IID 1015	17	M	2.21
(-)			0.06

#### 実施例 3

YK-1H5 の産生する IgG 抗体の臨床分離株に対する反応性の検討

ELISA により、YK-1H5 の産生する IgG 抗体の臨床

分離株に対する反応性を検討した。その結果を表 4 に示した。

表 4 より、YK-1H5 の産生する IgG 抗体は、いろいろな血清型の緑膿菌臨床分離株 (M 型を除く) の約 70% に対して結合を示した。さらに、血清型 M 型の臨床分離株 8 株中 8 株のすべてに対して、強く結合した。表 1 に示した、本間の血清型分類と Japanese Committee による血清型分類との相関によれば、本間血清型 15 及び 17 型は、Japanese Committee の M 型に対応する。標準株を用いた実験 (実施例 2) と臨床分離株を用いた実験 (実施例 3) の結果は、よく一致している。

表 4 YK-1H5 (IgG) の臨床分離株への結合性

菌 株	血 清 型*	ELISA 値 (OD <sub>495</sub> )
IID 1001	A	0.18
SP 9708a	A	0.23
SP 9710	A	0.50
SP 9711	A	0.24
SP 9731	A	0.38
<hr/>		
IID 1007	B	0.59
PA 0-1	B	1.33
M-2	B	0.35
TL 2460	B	0.25
SP 6747	B	0.59
SP 9703	B	0.43
SP 9722	B	0.61
SP 9737	B	0.91
SP 9756	B	0.17
SP 9770	B	0.36
SP 9791	B	0.21
<hr/>		
PA 103	E	0.85
NC5	E	0.65
TL 2092	E	0.36
TL 2158	E	0.91
SP 9702	E	0.68
SP 9715	E	1.03
SP 9720	E	1.14
SP 9723	E	0.52
SP 9726	E	0.68
SP 9740	E	2.18

表4 (つづき)

菌 株	血清型*	ELISA値 (OD <sub>495</sub> )
IID 1020	G	0.28
GN 11187	G	0.16
TL 2378	G	0.22
SP 6762	G	0.16
SP 6788	G	0.13
SP 9701	G	0.33
SP 9709	G	0.36
SP 9712	G	0.30
SP 9714	G	0.14
SP 9738	G	0.36
IID 5018	M	2.43
SP 9716	M	1.86
SP 9730	M	2.55
SP 9744	M	1.95
SP 9748	M	2.58
SP 9749	M	2.60
SP 9752	M	2.34
SP 9775	M	2.01
IID 1012	K	0.46
SP 9751	K	0.63
(-)	-	0.01

\* Japanese Committee による分類

ンブルブッファ (6.25mM トリスブッファ pH6.8/2%SDS/10% 2-メルカプトエタノール/10%グリセロール/0.001% BPB) 50  $\mu$  l とを混合し、73℃、85℃及び 100℃の各温度で10分間熱処理を行ない、0.2 % SDSを含む12.5%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後、ニトロセルロース膜に電気的にトランスファーした。このニトロセルロース膜上で酵素抗体染色法により、ヒト・モノクローナル抗体YK-1H5によって認識される抗原を同定した。外膜粗画分及びサンプルブッファ混合物を73℃、10分間の処理を行なった場合、YK-1H5によって特異的に認識する抗原として検出されたのは分子量 19Kの位置に単一に泳動される物質であった。ところが、100℃、10分間の処理では、分子量 25Kの位置に単一に泳動され、他方、85℃、10分間の処理では、分子量 19K及び、25Kの両方の位置に泳動される物質であった。なお、この外膜粗画分を蛋白分解酵素(proteinase K)により37℃、2時間処理後、電気泳動及びブロッティングすると、YK-1H5との反応性が消失した。このことは、

## 実施例 4

ヒト・モノクローナル抗体YK-1H5の認識する抗原(OMP-19)の検討

ウエスタン・ブロッティング(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76, 3116, 1979)の手法を用いて、ヒト・モノクローナル抗体YK-1H5の認識する抗原(OMP-19)の検討を以下のごとく行った。

まず、緑膿菌をハート・インフュージョン・ブイヨン培地(日水製薬)150 mlを用いて培養し、遠心により菌体を沈査とする。この沈査を20%ショ糖を含有する30mMトリス塩酸バッファ(PH8.0)に懸濁し、再度遠心することにより、菌体を洗浄する。次に、この沈査を20%ショ糖を含有する30mMトリス塩酸バッファ(PH8.0) 5 mlに懸濁する。その懸濁液に、リゾチーム、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を各 200  $\mu$  g/ml, 14mMとなるように加え、室温で40分静置の後、10,000g, 30分、4℃の条件で遠心し、上清を再度、10,000g, 30分、4℃の条件で遠心し、その上清を、緑膿菌外膜粗画分とした。得られた外膜粗画分50  $\mu$  l とサ

YK-1H5の認識する抗原が、蛋白性物質のものであることを指す。この蛋白性物質をOMP-19と命名した。

以上の結果より、ヒトモノクローナル抗体YK-1H5の認識する抗原OMP-19は、緑膿菌外膜中に存在する蛋白質から成り、1% SDS存在下73℃10分間加熱処理による可溶化条件では、SDS-PAGEにおいて分子量19K ダルトンを示し、1% SDS存在下 100℃10分間加熱処理による可溶化条件では、SDS-PAGEにおいて分子量25K ダルトルを示す、熱可変性の蛋白性物質であると結論される。

YK-1H5は、いずれの血清型の緑膿菌由来の外膜粗画分に対しても同等に強く反応することが、ウエスタンブロッティングによって示された。このことは、OMP-19が緑膿菌共通抗原であることを示す。実施例2及び3において示した、ELISAにおける緑膿菌菌体に対するYK-1H5の反応性の菌株毎による強弱の差異、及び、血清型別M型に対する特に強い反応性は、菌体の表層構造の差異に起因する、抗原(OMP-19)の露出度の差異によるも

のと考えられる。

#### 実施例 5

ヒト・モノクローナル抗体YK-1H5によるマウス  
実験的緑膿菌感染症の治療効果

緑膿菌 PA103, PA01, SP9730 株をICRマウス  
(4週令、雄、静岡県実験動物農業協同組合、1群  
10匹)の腹腔内に、それぞれ  $2.3 \times 10^4$  個、 $3.5$   
 $\times 10^4$  個、 $1 \times 10^4$  個感染後、1時間して、ヒト  
モノクローナル抗体YK-1H5を  $10 \mu\text{g/head}$  腹腔内投  
与し、7日後のマウスの生存率をもって治療効果  
を判定した。その結果を、表5に示す。

YK-1H5は、マウス実験的緑膿菌感染症において  
、治療効果を示した。

表5 マウス実験的緑膿菌感染症における治療効果

実験 No	被 検 菌 株	血 清 型	接 種 量 (CFV/head)	サ ン プ ル	生 存 率 (%)
1	P. aeruginosa	B	$2.3 \times 10^4$	YK-1H5*	60
	PA 103			None	30
2	P. aeruginosa	B	$3.5 \times 10^4$	YK-1H5*	90
	PA0-1			None	40
3	P. aeruginosa	M	$1.0 \times 10^4$	YK-1H5*	100
	SP-9730			None	30

\*  $10 \mu\text{g/head}$ , ip.

第1頁の続き

⑤Int. Cl.<sup>4</sup>

C 12 N 15/00  
C 12 P 21/00  
G 01 N 33/569  
33/577  
// (C 12 P 21/00  
C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

C-8412-4B  
D-6712-4B  
D-7906-2G  
B-7906-2G

⑦発明者 横田 伸一 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
内  
⑦発明者 野口 浩 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
内  
⑦発明者 上月 庸生 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友製薬株式会社内  
⑦発明者 加藤 益弘 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友製薬株式会社内  
⑦発明者 奥田 隆夫 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友製薬株式会社内